

Санкт-Петербургский государственный университет

Биологический факультет

Кафедра Цитологии и гистологии

Козырев Петр Александрович

Изучение микробиоты кишечника в норме и при патологиях

Выпускная квалификационная работа магистра

Работа выполнена в лаборатории

“Центр Алгоритмической биотехнологии”, СПбГУ

(зав. лаб. — кандидат физ.-мат. наук, проф. Певзнер П.А.)

Научный руководитель:

Проф. каф. Цитологии и гистологии, к.б.н., проф. Лapidус А.Л.

Санкт-Петербург

2018

1. Введение

Понятие “микробиота” (микрофлора) было предложено в начале этого столетия. Оно обозначает сообщество комменсальных, симбиотических и патогенных микроорганизмов, населяющих тело человека. Помимо обозначения всех микроорганизмов, населяющих наше тело, можно отдельно рассматривать микробиоту кожи, микробиоту ротовой полости, микробиоту кишечника и т.д.

Известно, что микробиота кишечника выполняет множество функций в организме: она участвует в пищеварительных процессах, производит различные витамины, защищает от чужеродных микроорганизмов. Состав кишечной микробиоты постоянно изменяется в зависимости от различных условий, таких как диета, действие лекарственных средств, состояние иммунной системы и др. При различных стрессовых воздействиях на организм может возникать состояние кишечного дисбиоза - резкого снижения разнообразия кишечной микробиоты и экспансии отдельных бактериальных таксонов. Показано, что кишечный дисбиоз наблюдается при таких заболеваниях, как Болезнь Крона, ожирение, Синдром раздраженного кишечника и многих других.

Одним из способов лечения дисбиотических состояний является прием препаратов, содержащих бактерии (пробиотики), способных вернуть микробиоту к нормальному состоянию. Так как микробиота кишечника является сложной системой, то трудно подобрать пробиотик, подходящий для каждого индивида. В связи с этим, популярной становится концепция аутопробиотиков - пробиотиков, полученных в результате культивирования бактерий самого индивида, которые лучше приживаются в организме.

Современные методы секвенирования сделали возможным более масштабные исследования микробиоты кишечника, позволяя одновременно изучать целые сообщества микроорганизмов. Для идентификации и классификации микроорганизмов как правило нет необходимости в секвенировании целых геномов. Для характеристики сообществ микроорганизмов общепринятым методом является секвенирование гена 16S малой субъединицы рибосом.

Целью данной работы является изучение микробиоты кишечника крыс при различных состояниях организма, а также поиск оптимальных видов/консорциумов бактерий, пригодных для терапии дисбиотических состояний на фоне приема антибиотиков.

В рамках поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

- 1) Изучить имеющиеся биоинформатические подходы к классификации микроорганизмов на основании секвенирования генов 16S. Провести сравнительный анализ и выбрать оптимальный подход.
- 2) Охарактеризовать изменения в составе микробиоты при дисбиотическом состоянии и при различных способах аутопробиотического лечения. Сделать заключение об эффективности разных типов лечения.

2. Обзор литературы

В последнее время ученые и врачи значительно изменили свое мнение о роли микробиоты в здоровье человека. Прежнее отношение к микроорганизмам, как к чему-то чужеродному или опасному для людей, превратилось в понимание того, что микробиота является естественным и даже необходимым компонентом для правильного функционирования человеческого организма.

Кишечник - орган человека, который наиболее сильно населен бактериями, количество которых значительно превышает суммарное количество клеток человека [1, 2]. Понимание этого позволило постепенно пересмотреть значение микробиоты кишечника в поддержании здоровья человека.

С появлением новых технологий секвенирования и благодаря совместным усилиям американской и европейской программы по исследованию микробиоты (Human Microbiome Project - www.hmpdacc.org and MetaHIT - [www.metahit.eu]) были выяснены состав и основные типы бактерий, представляющих человеческую микробиоту [1].

Установлено, что кишечная микробиота в основном представлена бактериями типа Фирмикуты (*Firmicutes*), Бактероиды (*Bacteroidetes*), Актинобактерии (*Actinobacteria*), Протеобактерии (*Proteobacteria*), Фузобактерии (*Fusobacteria*), а также Археями (*Archaea*). Преобладают в составе кишечной микробиоты Фирмикуты и Бактероиды [3, 4].

Состав микробиоты кишечника человека зависит как от диеты, так и от индивидуальных особенностей генетики и иммунной системы. Интересно, что в процессе развития состав микробиоты кишечника ребенка постепенно меняется: от преобладания бифидобактерий на этапе кормления грудью до преобладания бактероидов и фирмикутов в более поздние этапы жизни [6]. Индивидуальный состав микробиоты кишечника человека стабилен в течение жизни, оставаясь схожим с тем, который образовался в ранний период развития [5]. Эти открытия подтверждают то, что состав микробиоты кишечника у взрослых, будучи крайне индивидуальным, стабилен и склонен к возвращению к исходному состоянию после временных дисбиотических расстройств [7].

Огромное количество данных секвенирования микробиоты кишечника с последующим биоинформатическим анализом позволило создать концепцию энтеротипов. Согласно Arumugam et al. [8], кишечную микробиоту человека можно разделить на три энтеротипа: с преобладанием бактерий рода *Bacteroides*, другой - с бактериями рода *Prevotella* и третий - с фирмикутами со слегка повышенным содержанием бактерий рода *Ruminococcus*. Это распределение оказалось никак не связано с диетой, индексом массы

тела, расой или полом. Вслед за этими данными последовали другие исследования, которые утверждали наличие двух или четырех энтеротипов [9, 10].

Кишечная микробиота участвует в переваривании пищи, синтезе витаминов, катаболизме холестерина, участвует в формировании множества иммунных реакций врожденного и приобретенного иммунитета и регулируют взаимоотношения человека с патогенными микроорганизмами [11, 12].

Установлено, что многие соматические болезни и расстройства желудочно-кишечного тракта развиваются в результате изменений в составе микробиоты кишечника (дисбиоза) в результате стресса, инфекции, радиационных воздействий или приема антибиотиков. Дисбиоз ассоциирован с такими заболеваниями, как антибиотик-ассоциированная диарея, воспалительные заболевания кишечника, синдром приобретенного иммунодефицита, ожирение и другие [13].

В зависимости от изменения состава микробиоты дисбиотические состояния могут проходить сами собой или трансформироваться в различные патологии, которые требуют специального лечения.

2.1 Дисбиоз кишечника

Иногда микробиоту кишечника рассматривают как отдельный орган. Как и в случае других органов, правильное функционирование микробиоты кишечника зависит от стабильного клеточного состава, который в случае микробиоты человека состоит в основном из бактерий типа *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* и в меньшей степени *Proteobacteria* [14]. Большие сдвиги в соотношении между этими типами или экспансия новых бактериальных групп приводят к дисбалансу, способствующему развитию болезней, который часто называют дисбиозом. Уменьшение микробного разнообразия и экспансия *Proteobacteria* являются ключевыми признаками дисбиоза [15, 16].

Вклад специфических микробов в заболевание изучается путем исследования изменений состава популяций бактерий на основе высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК [17].

Трансплантация микробиоты кишечника от больного животного здоровому является следующим шагом, чтобы подтвердить вклад дисбактериоза кишечника в болезнь. Так, трансплантация микробиоты продемонстрировала вклад кишечных микробов в ожирение [18] и атеросклероз [19] у мышей.

Несмотря на убедительные доказательства, полученные в результате секвенирования гена 16S и трансплантации микробиоты, вклад специфических бактериальных групп в развитие заболевания часто остается косвенным.

Также, граница между “добром и злом” часто размывается - некоторые симбиотические бактерии могут стать патогенными, когда они присутствуют в большем количестве в кишечнике.

Лекарственные средства

Пероральное введение является наиболее часто применяемым методом употребления лекарств. Удобство этого пути позволяет регулярно употреблять лекарственные средства без медицинского вмешательства. Однако, это увеличивает воздействие лекарств на микробиоту кишечника и тем самым может способствовать дисбактериозу.

Обычные нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, такие как аспирин, ибупрофен и напроксен, влияют на микробную композицию кишечника при ежедневном применении, что подтверждается увеличением обилия *Bacteroidaceae* и *Enterobacteriaceae* [20].

Воздействие лекарственных средств на кишечную микробиоту подчеркивает важность их аккуратного применения. Например, ингибитор печеночного глюконеогенеза метформин, является стандартным лекарственным средством, используемым при лечении диабета типа 2. Как было недавно показано, применение метформина изменяет состав микробиоты кишечника путем повышения доли *E.coli* [21].

Благодаря своей антибактериальной активности антибиотики могут участвовать в развитии дисбактериоза кишечника. Большинство перорально вводимых антибиотиков изменяют микробиоту кишечника во время их применения. Однако некоторые антибиотики способны вызывать длительные изменения в микробиоте кишечника. В то время как несколько антибиотиков, таких как амоксициллин, не имеют какого-либо значимого долгосрочного воздействия на микробиоту кишечника, лечение детей с помощью макролидных антибиотиков приводит к длительному снижению количества *Firmicutes* и *Actinobacteria* с одновременным увеличением *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* [22].

Повторное воздействие антибиотиков может дестабилизировать микробиоту кишечника и способствовать экспансии устойчивых к антибиотикам патогенных бактерий, в результате чего у пожилых людей может развиваться диарея, связанная с *C. difficile* [23]. В дополнение к их ожидаемым антибиотическим эффектам некоторые антибиотики также оказывают эубиотическое действие [24], способствуя распространению благоприятных для здоровья бактерий путем подавления патогенов. Такой эубиотический эффект типичен для рифаксимины, что способствует увеличению микробного разнообразия у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника [25], а также улучшает симптомы синдрома раздраженного кишечника [26].

Заболевания при дисбиозе

Болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК) являются наиболее распространенными формами воспалительного заболевания кишечника (ВЗК). Они характеризуются хроническим рецидивирующим воспалением, влияющим на слизистую оболочку кишечника. Хотя этиология обоих заболеваний неизвестна, находится все больше доказательств того, что дисбактериоз кишечника играет определенную роль в патогенезе ВЗК (27).

В целом, у пациентов наблюдается снижение разнообразия микробиоты кишечника и её стабильности с уменьшением *Firmicutes* и сопутствующим увеличением *Bacteroidetes* и факультативных анаэробов, таких как *Enterobacteriaceae* (28). Также отмечены значительные различия в кишечной микробиоте при БК и ЯК (29, 30). Было показано, что в БК дисбактериоз ассоциирован с пятью видами бактерий, среди которых изменения в содержании *Faecalibacterium prausnitzii* связаны с продлением ремиссии заболевания (30, 31). Эта бактерия также обладала терапевтическим эффектом в экспериментальных моделях колита (32).

Помимо ВЗК, метаболических расстройств, ожирения и диабета 2 типа, кишечная микробиота также участвует в ряде других (хронических) заболеваний и расстройств, связанных с ЖКТ, таких как синдром раздраженной кишки (СРК), целиакия, и колоректального рака. В СРК изменения в составе микробиоты были описаны для разных подтипов заболевания по сравнению со здоровыми людьми (33, 34), хотя изменения были неоднородными (35). Целиакия и колоректальный рак также были связаны с изменениями в составе микробиоты, наблюдаемыми по сравнению с контролем (36, 37). Тем не менее, во всех этих заболеваниях не наблюдается последовательной картины изменений микробиоты.

Увеличение относительной численности *Firmicutes* и снижение уровня *Bacteroidetes* наблюдалось как у мышей с ожирением (38), так и у людей (39), хотя эти результаты не были воспроизведены в других исследованиях (40-46). Следует отметить, что дисбактериоз кишечника в настоящее время не используется в качестве фактора для диагностики или прогнозирования возникновения метаболических заболеваний, таких как ожирение или диабет 2 типа.

Кишечный дисбактериоз также наблюдался при заболеваниях, при которых меняется функционирование ЦНС и поведение. В нескольких исследованиях основное внимание уделялось тому, что микробиота кишечника может влиять на когнитивную функцию и поведение путем прямого перепрограммирования гипоталамуса-гипофизарно-

надпочечниковой (НРА) оси - общего пути, активирующегося в ответ на инфекцию и подверженного воздействию психологических стрессоров.

У инфицированных патогенами мышей (47-50) *Campylobacter jejuni* (распространенная причина гастроэнтерита) может вызывать тревожное поведение активацию ствола мозга (*nucleus tractus solitarius* и *lateral parabrachial nucleus*). Комменсальные бактерии могут влиять на мозг через ГАМК, что может напрямую влиять как на иммунные, так и нейронные рецепторы в энтеральной нервной системе и ЦНС (51, 52). ГАМК является основным тормозным нейротрансмиттером ЦНС и участвует в регулировании физиологических и психологических процессов. Изменения в экспрессии ГАМК-рецепторов связаны с патогенезом тревожности и депрессии (53).

Известно, что ранняя колонизация кишечного тракта микробами важна для постнатального развития кишечной нервной системы (54). Соответственно, кишечная микробиота может иметь последствия для развития и функционирования ЦНС (55, 56).

2.2 Лечение дисбиоза

История использования пробиотиков

Вероятнее всего, первопричиной использования бактерий людьми была потребность в консервации пищи. Нерегулярный доступ к пище диктовал потребность в её сохранении в ферментированной форме для спасения от голода. Так, ферментированные молочные продукты (сыр, йогурт и др.) способны сохранять питательные свойства в течение нескольких месяцев. Это позволяло людям совершать длительные путешествия, способствуя расселению людей по Земле.

Первые положительные эффекты на здоровье человека были показаны для бактерий из отряда лактобацилл. Считалось, что йогурт, кефир, кумыс, айран и многие другие ферментированные молочные продукты обладают мистическими свойствами из-за их положительного влияния на здоровье человека и продолжительность жизни.

В конце 19 века Нобелевский лауреат Илья Мечников был первым ученым, кто исследовал лактобациллы. Мечников отметил корреляцию между долгожительством болгарских пастухов и йогуртами в их пищевом рационе. В результате этих исследований, он первым предположил, что люди могут жить значительно дольше, если они будут потреблять необходимые бактерии [57].

Коллабораторы Мечникова в Институте Пастера были первыми, кто провел эксперименты на стерильных животных - такие животные были свободны от микроорганизмов. Мечников был не только первым, кто изучал бактерии в ферментированном молоке, но и способствовал созданию первого бактериального лекарственного средства, Лактобациллина, который производился в Санкт-Петербурге в 1912 году. Это было

задолго до того, как Альфред Ниссле в 1917 году выделил штамм кишечной палочки, который впоследствии также использовался в качестве пробиотика и ошибочно считается первым пробиотиком в истории.

Продукты, содержащие лактобациллы, одобренные как лекарственные средства с коммерческими названиями, “Лактобактерин”, “Бифидумбактерин” и “Колибактерин” все еще находятся на фармацевтическом рынке Российской Федерации. Например, Бифидумбактерин - препарат, содержащий бифидобактерии, был разработан в 1966 году, а промышленное производство его началось в 1972 году [58].

Производство «Лактобактерина» (пробиотическое лекарственное средство, содержащее *Lactobacillus plantarum*, штамм 8P-A3) также начиналось в 70-е годы. Термин «пробиотик», обозначающий пищу или лекарственные средства, содержащие полезные для здоровья бактерии, появился в мировой литературе гораздо позже, в 80-е годы, после возрождения интереса к этим бактериям [59].

Пробиотики и их влияние на здоровье человека

Использование пробиотиков в качестве полезных для здоровья продуктов или ингредиентов, содержащих живые бактерии, огромно, и постоянно растет число различных продуктов и фармацевтических препаратов.

Большинство распространенных пробиотических штаммов относятся к группе лактобацилл и бифидобактерий. Лактобациллы включают несколько разных родов: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* и некоторые другие. Начиная с Мечникова, исследования лактобацилл и их использования в качестве пробиотиков были преимущественно сосредоточены на роде *Lactobacillus*.

Пробиотики на основе лактобацилл из рода *Enterococcus* хорошо представлены на постсоветском и восточноевропейском рынках и менее распространены в Западной Европе и Соединенных Штатах. Например, содержащие *Enterococcus* препараты Linex и Bifiform составляют более 80% российского рынка пробиотиков.

Среди других пробиотических штаммов следует упомянуть бифидобактерии как доминирующую микробиоту у детей с грудным вскармливанием, которые также являются важными компонентами как пробиотических препаратов, так и пищевых продуктов. Другие пробиотики на рынке относятся к разным видам бацилл, *E.coli*, сахаромицетов и некоторых клостридиальных штаммов [60, 61].

В настоящее время проводится большое количество соответствующих клинических исследований с пробиотиками и даже производится метаанализ существующих исследований. Некоторые из этих исследований, направлены на лечение желудочно-

кишечных заболеваний, таких как синдром раздраженной кишки [62-65], болезнь Крона [66-68], язвенный колит [69-70] и др.

Положительные результаты пробиотического лечения в большинстве исследований отражают эффективность их использования в клинической практике. Однако результаты лечения с использованием разных или даже одинаковых штаммов варьируют от исследования к исследованию. К примеру, в случае лечения синдрома раздраженного кишечника (СРК) вместе с исследованиями, демонстрирующими положительный эффект пробиотической терапии, в некоторых исследованиях не было различий по сравнению с контролем или даже было показано обострение патологии [71-74].

В недавнем исследовании пациентов с СРК потребление *L. plantarum* MF 1298 было связано со значительным обострением симптомов заболевания, но ни прием *L. plantarum* MF 1298, ни симптомы не были связаны с составом фекальной микробиоты [71]. Наиболее впечатляющими в этом отношении были результаты клинического исследования пациентов с острым панкреатитом, в которых умерло 16% пациентов в группе, принимающей пробиотики, по сравнению с 6% в контрольной группе [75].

Это расхождение в результатах клинических исследований отражает тот факт, что пробиотические бактерии, вводимые отдельным пациентам с их собственной уникальной микробиотой, могут взаимодействовать с тканями хозяина или их собственной микробиотой по-разному. Эти возможные побочные эффекты микробной терапии, которые были доказаны как эффективные в большинстве исследований, также постулируются Matsushima и Takagi [76]. Однако точное предсказание функционирования пробиотиков в кишечнике невозможно без понимания физиологии пробиотических штаммов и способа их взаимодействия с хозяином.

Механизмы действия пробиотиков

В многочисленных обзорах, описывающих использование пробиотиков, упоминается несколько особенностей штаммов, включенных в препараты. Пробиотики должны быть человеческого или животного происхождения в зависимости от их предполагаемого использования. Они должны обладать способностью выжить в достаточном количестве, а также проходить через кишечник (желчь- и кислотоустойчивость), быть безопасными для потребления и способными прикрепиться к слизистой оболочке кишечника. Они должны оказывать антагонистическое воздействие на патогены и препятствовать транслокации патогенных бактерий, а также модулировать иммунную систему [59, 71-74, 77]. Однако, ни один из пробиотических штаммов не отвечает этим критериям полностью или исследования, показывающие это, не убедительны.

Три вещи, касающиеся пробиотических функций, наиболее очевидны: антагонистический потенциал, влияние пробиотиков на процесс пищеварения и иммуномодуляцию.

Антагонистическая активность большинства пробиотических штаммов может быть изучена за пределами хозяина, что позволяет оценить диапазон пораженных оппортунистических / патогенных бактерий. Существуют различные механизмы антибактериального действия, но синтез органических кислот и антимикробных пептидов (бактериоцинов) является наиболее распространенным оружием бактериальных войн за место или питательные вещества.

Экспрессия многих бактериоцинов лактобактерий, энтерококков или бифидобактерий строго регулируется сложными генетическими регуляторными системами, включающими трехкомпонентную сигнализацию и активацию феромонов механизмом “Ощущения кворума” (Quorum sensing) [78-80]. Большинство штаммов, продуцирующих бактериоцин, генерируют пептиды, ингибирующие рост узкого диапазона бактерий с аналогичными предпочтениями расселения; однако некоторые пробиотики, такие как *L. plantarum* 8P-A3 или *E. faecium* L3, синтезируют множественные бактериоцины с чрезвычайно высокой ингибирующей активностью против грамположительных и грамотрицательных патогенов [79, 80]. Подобные эффекты были обнаружены в исследованиях с другими бактериоцинами, выделенными из лактобацилл [81, 82].

Появление пробиотиков в кишечнике оказывает заметные метаболические эффекты на организм, такие как снижение уровня холестерина, производство витаминов, диабет или ожирение [77, 83-85]. Однако обычно трудно различить эффекты от небольшого количества бактерий, вводимых в общую микробиоту. Эти реакции нагляднее наблюдаются у гнотобиотических животных или животных с искусственно индуцированным дисбиозом [86]. Здоровая микробиота обычно устойчива к колонизации внешними микроорганизмами [87].

Объективная оценка иммуномодулирующих функций пробиотиков имеет аналогичные проблемы, потому что тесты обычно выполняются либо на организмах с устоявшейся микробиотой, либо гнотобионтами, которые, как известно, имеют дефектную врожденную иммунную систему. Обе эти модели имеют свои недостатки. Установлено, что пробиотики действительно влияют на врожденные и адаптивные иммунные функции, связанные с toll-like-рецепторами (TLR) и их нижестоящими системами, включая пути NF- κ B, JAKSTAT, MAPK и SAPK / JNK. За этими реакциями следует дифференциальная экспрессия интерлейкинов и дефенсинов, которая может варьировать в зависимости от типа используемого пробиотика.

Например, наиболее распространенными реакциями на пробиотические лактобациллы или энтерококки являются подавление экспрессии NF-κB и IL-8 и индукция IL-10 [88-92]. Однако эти эффекты очень штамм-специфичны. Различные штаммы, относящиеся к одному и тому же виду, могут модулировать иммунный ответ совсем по-разному с помощью поляризации Т-хелперов (Th1 / Th2).

Еще одна особенность пробиотиков, которая в последнее время подвергается интенсивному исследованию, - это их влияние на целостность эпителия. Пробиотики могут влиять на экспрессию белка в плотных контактах, блокируя процесс бактериальной транслокации [93]. Эти эффекты были более заметны в случае, когда микробиота экспериментальных животных находилась в искусственно индуцированном дисбиотическом состоянии [93-95].

Безопасность использования пробиотиков

Многие ученые и особенно врачи, работающие в этой области, рассматривают только лактобациллы и бифидобактерии, как безопасные пробиотики. Они полностью игнорируют тот факт, что многие пробиотики, включая вышеупомянутые, несут предполагаемые факторы патогенности и мобильные генетические элементы в их геномах. С другой стороны, штаммы с длинной историей успешного использования в качестве пробиотиков, принадлежащих к таким видам, как *E.coli*, энтерококки или *Bacillus subtilis*, считаются потенциально опасными.

Однако эта точка зрения не имеет ничего общего с микробной экологией или здравым смыслом и на самом деле вредит всей концепции клинического использования пробиотиков. Бактерии, обладающие высокой пластичностью и адаптивностью к различным средам, “не уважают человеческие моральные ценности” и не особенно нацелены на людей. Единственное, что они могут сделать и будут делать, это распространяться в присутствии соответствующих питательных веществ и в определенных средах.

Многие штаммы *Lactobacillus salivarius*, используемые в нескольких пробиотических препаратах, на самом деле экспрессируют фибриноген-связывающий белок, кодируемый геном CCUG_2371. Наличие этого фактора вирулентности в штамме может привести к агрегации тромбоцитов, облегчающей септическую инфекцию [96]. Наиболее часто используемый и изученный пробиотический штамм *Lactobacillus rhamnosus* GG содержит гены устойчивости к ванкомицину и 5 “геномных островков” (в других организмах они называются островками патогенности) с несколькими бактериофагами и генами для 3-х поверхностных экспрессированных LPXTG-подобных пилинов (spaCBA) [97].

Однако те же генетические признаки у других видов, таких как энтерококки, считаются факторами вирулентности. Это хороший пример псевдонаучного подхода с двойными стандартами, который распространяется под давлением крупных промышленных корпораций, продающих определенные типы пробиотиков. С другой стороны, этот способ мышления отражает естественное желание следовать образцу общепринятых стереотипов.

Аутопробиотики и фекальная трансплантация

Общепризнано, что по крайней мере некоторые преимущества для здоровья от применения пробиотиков происходят в результате взаимодействия пробиотических штаммов с микробиотой хозяина. Также установлено, что положительные эффекты пробиотика наиболее очевидны в дисбиотических условиях и не наблюдаются в здоровой микробиоте.

Другими способами восстановления нормальной микробиоты являются фекальная трансплантация или аутопробиотическая терапия. Трансплантация фекалий - это медицинская процедура, основанная на замене микробиоты хозяина микробиотой донора. Эта процедура была оценена в нескольких клинических исследованиях пациентов с воспалительным заболеванием кишечника или при лечении инфекции *Clostridium difficile* [98, 99]. Этот подход имеет слабое место - донорская микробиота может содержать оппортунистические бактерии, способные вызвать проблемы у больного. В исследовании здоровых людей около 50% индигенных энтерококков несли несколько предполагаемых факторов вирулентности в своем геноме [100]. Притом очевидно, что энтерококки не являются самыми опасными бактериями в кишечнике.

Другой подход основан на индигенных бактериях, используемых для восстановления нормальной микробиоты в случае дисбиотического состояния [102]. Такой подход, названный аутопробиотической технологией, основан на выделении отдельных штаммов из микробиоты и возвращении бактерий обратно в кишечник после их размножения вне организма, что позволяет анализировать каждый отдельный штамм и возвращать их хозяину.

Обычно требуется неделя, чтобы приготовить аутопробиотический препарат для пациента. В клинических исследованиях пациентов с СРК, язвенным колитом и пневмонией, аутопробиотики, введенные пациентам с использованием рандомизированного плацебо-контролируемого подхода, дали значительные положительные эффекты, о чем свидетельствуют большинство клинических параметров [101].

2.3 Биоинформатический анализ микробиоты

Одним из фундаментальных вопросов в исследованиях микробиоты является оценка микробного разнообразия в исследуемой среде. И наиболее распространенный подход заключается в анализировании генов 16S рРНК в образцах с использованием метода амплификации последовательностей, установленного и разработанного в течение последнего десятилетия.

В более ранних исследованиях пиросеквенирование (т.е. секвенирование 454) являлось основной платформой секвенирования, которая прошла несколько поколений с каждой новой платформой, предлагающей более длинные чтения. После прекращения выпуска секвенирующих платформ 454 в 2013 году Illumina MiSeq стала доминирующей платформой для секвенирования ампликонов 16S рРНК.

Последовательности 16S рРНК обычно анализируются с помощью кластерного подхода для получения операционных таксономических единиц (ОТЕ), которые описывают различные группы микробных организмов на разных таксономических уровнях. ОТЕ, сгруппированные с идентичностью последовательности равным 97%, обычно используется для представления отдельных видов. Однако шум при ПЦР-амплификации и ошибки секвенирования часто вызывают завышение реального количества ОТЕ [103, 104].

Так, в прошлом было разработано много методов и протоколов для выявления этих ошибок и уменьшения ложных ОТЕ. Для данных с платформ 454 наиболее распространенными программами для уменьшения шума являются PyroNoise [105], Denoiser [106] и AmpliconNoise [107]. Кроме того, большинство методов использовало строгую фильтрацию качества и обрезку сырых прочтений, а некоторые методы также использовали процесс предварительной кластеризации, как это было показано в SLP [103]. Для идентификации химерных чтений были созданы как методы использующие референс, такие как ChimeraSlayer [108], так и *de novo* подходы (например, UCHIME [109]).

Многие методы и протоколы, разработанные для данных платформы 454, такие как строгая фильтрация качества и предварительная кластеризация, все еще применяются в анализе данных MiSeq. Эти методы доступны в таких часто используемых программах, как Mothur [110] и Qiime [111].

Одна уникальная особенность технологии MiSeq по сравнению с пиросеквенированием - это парноконцевые (парные) прочтения, причем прямое чтение (R1) и обратное чтение (R2) могут иметь длину до 250-300 оснований. Таким образом, парные прочтения могут охватывать несколько переменных областей гена 16S рРНК. Однако, парные прочтения должны быть собраны в одну непрерывную последовательность (контиг) в начале

анализа. Это возможно в том случае, если секвенируются близлежащие фрагменты гена 16S рРНК и суммарная длина парных прочтений больше, чем длина секвенируемого фрагмента гена. В таком случае становится возможным объединение парных прочтений по перекрытиям их концов.

MiSeq, как и некоторые другие секвенаторы Illumina, имеет большее число ошибок определения оснований к концу прочтения. Также прочтения R2, как правило, содержат больше ошибок, чем R1. Все это приводит к тому, что многие парные прочтения просто не могут быть собраны по перекрытиям без учета ошибочно определенных оснований. Все это привело к разработке методов для объединения парных прочтений, которые учитывают возможное несоответствие оснований. PANDAseq [112] и PEAR [113] - две программы, которые могут эффективно собирать большое количество парных прочтений. Другие программы, которые способны объединять прочтения, включают FLASH [114] и COPE [115]. Кроме того, у таких программ, как Mothur и Qiime, есть встроенный инструмент для сборки парных прочтений в контиги.

Несмотря на то, что для объединения парных прочтений существует много программ, для некоторых наборов данных большая часть прочтений не может быть объединена из-за плохого качества определения оснований на 3' концах обоих прочтений в области перекрытия. Даже если контиги могут быть собраны, позволяя много несоответствий в области перекрытия, они могут иметь слишком много ошибок, что мешает их дальнейшему использованию. Фактически, отказ от низкокачественных контигов - это стандартный шаг в таких программах, как Mothur.

В прошлом была разработана сверхбыстрая программа для кластеризации прочтений - CD-HIT [116-119], которая широко использовалась для кластеризации последовательностей гена 16S. Чтобы решить проблему завышения количества ОТЕ из-за ошибок в данных с платформы 454, была разработана аналитическая цепочка CD-HIT-OTU [120], обладающая высокой скоростью и точностью.

Также был разработан еще один подход, основанный на пакете CD-HIT для кластеризации и аннотации данных последовательности 16S на основе MiSeq - CD-HIT-OTU-MiSeq.

Этот подход имеет четыре особенности. (1) Пакет CD-HIT-OTU-MiSeq может кластеризовать парные прочтения без необходимости их объединения в контиги, поэтому CD-HIT-OTU-MiSeq может работать с парными прочтениями, которые невозможно эффективно собрать. (2) Пользователь может выбирать и анализировать только высококачественную часть прочтений - например 200 первых нуклеотидов из R1 и 150 первых нуклеотидов из R2, в соответствии с профилем качества определения нуклеотидов. (3) Реализован инструмент, который может вырезать нужный фрагмент гена

16S (например, V3-V4) из базы данных с последовательностями 16S в виде парных прочтений. CD-HIT-OTU-MiSeq может кластеризовать вырезанные фрагменты из базы вместе с прочтения из исследуемых образцов. Это позволяет получать ОТЕ и аннотировать их одновременно. (4) Химерные последовательности эффективно идентифицируются с помощью подхода *de novo*. Кроме того, CD-HIT-OTU-MiSeq применяет другие подходы, снижающие шум, из предыдущего пакета CD-HIT-OTU.

3. Материалы и методы

Культивирование бактерий и работа с животными были выполнены нашими коллегами из ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины".

3.1 Экспериментальные животные

Эксперименты были выполнены на 122 самцах крыс линии Wistar (вес 200-250г в возрасте 6-7 недель), полученных из питомника "Рапполово". Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществлялось в соответствии с требованиями "Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных" (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1997 г. № 755). Все животные содержались в стандартных условиях температуры (18-22 С), влажности (50-60%), режиме освещения (12 часов день, 12 часов ночь), шума (до 85 Дб), а также рациона питания (комбикорм ПК-120-1, Россия). Эксперименты проведены в полном соответствии с Директивой Европейского Совета (The European Council Directive 86/609/EEC) по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными и одобрены локальным этическим комитетом по ФГБНУ "ИЭМ".

3.2 Культивирование бактерий

Из фекалий здоровых крыс выделялись индивидуальные клоны бактерий, соответствующие каждому животному, которые в дальнейшем культивировались на питательных средах.

3.3 Используемые антимикробные препараты

Для того, чтобы вызвать дисбиоз у экспериментальных животных, в течение 3 дней совместно использовались следующие антимикробные препараты: 75 мг/кг ампициллина (ОАО "Органика", Россия) и 50 мг/кг метронидазола (ОАО "Ирбитский Химико-Фармацевтический завод", Россия).

3.4 Модель антибиотико-ассоциированного дисбиоза у крыс

Здоровым крысам давались антимикробные препараты для того, чтобы вызвать у них дисбиотическое состояние. Затем животные в состоянии дисбиоза получали внутрижелудочно лечение в виде аутопробиотиков. Микробиота кишечника животных оценивалась при помощи биоинформатического анализа. Сбор данных для анализа проходил в 3 этапа: в первый день эксперимента у крыс брали образцы фекалий для анализа микробиома здоровых крыс, затем в течение 3 дней им давали антимикробные препараты. После этого у животных снова брали фекалии для анализа изменения состава микробиоты в состоянии дисбиоза. И затем в течение 5 дней животные получали лечение для восстановления микробиоты. После этого, на восьмой день эксперимента, у крыс повторно забирали образцы для анализа эффективности

восстановления микробиоты после лечения.

Контрольная группа №1 (K1) после трехдневного приема антимикробных препаратов получала в качестве лечения физиологический раствор в течение 5 дней. Контрольная группа №2 (K2) получала физиологический раствор в течение всего эксперимента (8 дней).

Группы животных описаны в **таблице 1** ниже и классифицируются по типу получаемого лечения.

Название группы	Описание	Количество животных в группе
сосс	Получали в качестве лечения чистую культуру аутопробиотических энтерококков	12
lacto	Получали в качестве лечения чистую культуру аутопробиотических лактобацилл	17
bifido	Получали в качестве лечения чистую культуру аутопробиотических бифидобактерий	11
auto	Получали в качестве лечения смесь культур аутопробиотических энтерококков, лактобацилл и бифидобактерий	10
anaero	Получали в качестве лечения консорциум аутопробиотических	12

	бактерий, выращенных в анаэробных условиях	
feces	Получали в качестве лечения разведенные фекалии	15
L3	Получали в качестве лечения пробиотические энтерококки	12
k1	Контрольная группа. Получала в качестве лечения физиологический раствор.	17
k2	Контрольная группа. Получала в течение всего эксперимента только физиологический раствор.	16

Таб. 1. Экспериментальные группы животных

3.5 Секвенирование и биоинформатический анализ

Для характеристики микробиоты животных производилось парноконцевое секвенирование переменных фрагментов V3-V4 гена 16S с использованием праймеров, фланкирующих данный участок. Данные были получены на платформе Illumina Miseq.

Для анализа данных секвенирования гена 16S была разработана аналитическая цепочка, состоящая из нескольких шагов: анализ качества и фильтрация полученных с секвенатора прочтений, классификация прочтений, визуализация и обработка результатов.

Анализ качества и фильтрация прочтений

Данный этап предшествует анализу данных. Его необходимость обусловлена рядом причин. Так, данные, производимые инструментами компании Illumina, могут содержать ошибочные по составу (остатки праймеров, адаптеров, баркодов) и/или плохие по качеству последовательности в начале или конце прочтений. Удаление этих последовательностей позволяет получить корректные результаты в ходе последующих этапов анализа.

Анализ качества чтений перед кластеризацией проводился с использованием программы fastqc [<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>]. С помощью анализа графических отчетов fastqc были выбраны части прочтений с хорошим качеством – 200 нуклеотидов для прочтений R1 (левых) и 180 нуклеотидов для прочтений R2 (правых). Удаление плохих по качеству последовательностей прочтений производилось при помощи программы Trimmomatic [<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>].

Классификация прочтений

Классификация прочтений в исследуемых образцах производилась при помощи алгоритма CD-HIT-OTU-MiSeq

[<https://github.com/weizhongli/cdhit/tree/master/usecases/Miseq-16S>].

При кластеризации прочтений использовался порог сходства в 97%. Предыдущие исследования показали, что при таком пороге сходства получившиеся кластеры (также называемые OTU – operational taxonomic units) на таксономическом уровне соответствуют видам микроорганизмов. Кластеризованные последовательности сравнивались с базой проаннотированных геномов микроорганизмов Greengene v.13.5.

Визуализация и обработка результатов

Визуализация и обработка полученных данных классификации производилась с использованием языка для статистической обработки R в пакете phyloseq [<https://joey711.github.io/phyloseq/>].

Представленности микроорганизмов каждого класса были просуммированы, и OTU, соответствующие классам, представленным менее, чем в 5% образцов, были отброшены. Представленности микроорганизмов были нормализованы на сумму представленностей всех OTU каждого образца.

4. Результаты

4.1. Изучение имеющихся биоинформатических подходов к классификации микроорганизмов на основании секвенирования генов 16S. Проведение сравнительного анализа. Выбор оптимального подхода.

На данный момент существует множество программ для анализа и обработки 16S сиквенсных данных. Многие из них выполняют какую-то конкретную функцию, в то время как другие могут решать сразу несколько задач вплоть до выполнения всего аналитического процесса.

Изначальная схема нашего анализа (рис. 1) включала в себя объединение парноконцевых прочтений, контроль качества, классификацию и обработку результатов с последующей визуализацией. Уже на этапе объединения парных прочтений в контиги можно было оценить качество определения нуклеотидов - если оно было плохое, то многие прочтения просто не могли быть объединены. Тогда требовалась очистка низкокачественных данных. Затем производилась повторная попытка объединить парные прочтения.

После очистки данных производилась их классификация. Если большую часть данных удавалось классифицировать, то затем производилась обработка результатов и их последующая визуализация в R.

Если же большинство последовательностей классифицировать не получалось, то возникал вопрос, в чем причины. А они могут быть разные: плохое качество библиотеки для секвенирования, неправильные параметры запуска программы и т.д. В каждом случае приходилось выяснять это индивидуально.

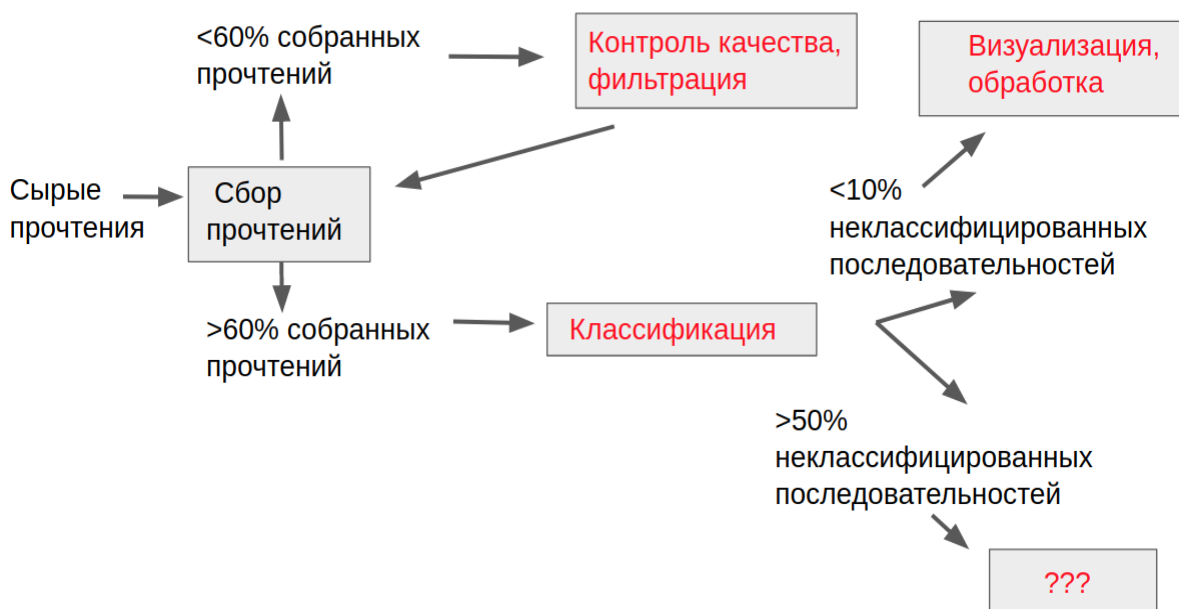


Рисунок 1. Первоначальная схема биоинформатического анализа

Первоначальный подход оказался неэффективным, потому что уже на этапе объединения прочтений мы теряли много данных. Точность классификации также была относительно низкой.

В ходе работы нами были рассмотрены другие программы для анализа 16S сиквенсных данных. Оценка каждой из них по выбранным нами субъективным критериям (рис. 2) показало, что подход CD-HIT-OTU-Miseq, помимо удобства использования и высокой скорости работы позволяет кластеризовать и классифицировать парные прочтения по отдельности, что избавляет от необходимости в объединении парных прочтений перед началом анализа.

	Mothur	Qiime	CD-HIT-OTU-Miseq
Легкость использования			
Время работы			
Эффективность взаимодействия с пользователями/разработчиками			
Качество получаемых результатов			

Рисунок 2. Оценка различных программ для анализа 16S сиквенсных данных по выбранным критериям: легкость использования, время работы, эффективность взаимодействия с пользователями/разработчиками и качество получаемых результатов. Зеленый цвет - положительная оценка, желтый - нейтральная, красный - отрицательная.

После этого схема аналитического процесса стала выглядеть следующим образом (рис. 3).

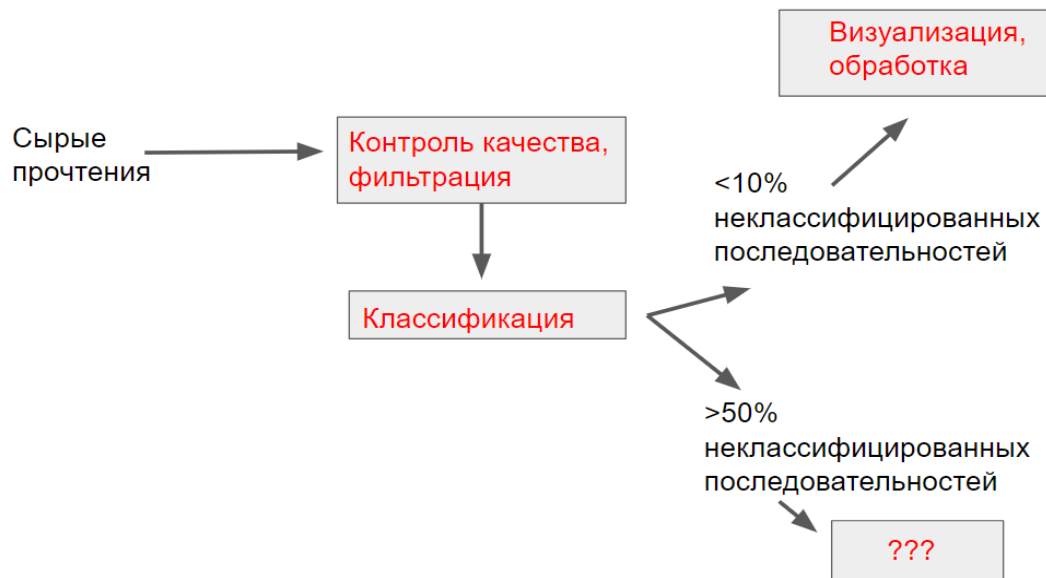


Рисунок 3. Текущая схема биоинформатического анализа

Отказ от необходимости в объединении парных прочтений в контиги изменил получаемые результаты. Так, новый подход позволяет сохранить больше данных (91% против 57%) для последующего анализа (рис. 4).



Рисунок 4. Новый подход позволяет сохранить больше данных.

Помимо этого, при использовании нового подхода (рис. 5), количество классифицированных прочтений также увеличилось (84% против 80%).



Рисунок 5. Новый подход позволяет классифицировать большее число прочтений.

4.2 Характеристика изменений в составе микробиоты при дисбиотическом состоянии и при различных способах аутопробиотического лечения. Заключение об эффективности разных типов лечения.

Анализ сходства микробиоты кишечника методом главных компонент был проведен в R. Метод главных компонент является одним из наиболее популярных способов уменьшения размерности данных. На этом графике мы обратили внимание на то, что крысы в состоянии дисбиоза стоят на графике отдельно (рис. 6), что свидетельствует о том, что их кишечная микробиота сильно отличается от микробиоты остальных крыс.

Помимо этого мы отметили, что животные, получавшие после антибиотика физиологический раствор, дают более разнообразную и непредсказуемую картину восстановления кишечной микробиоты (рис. 6).

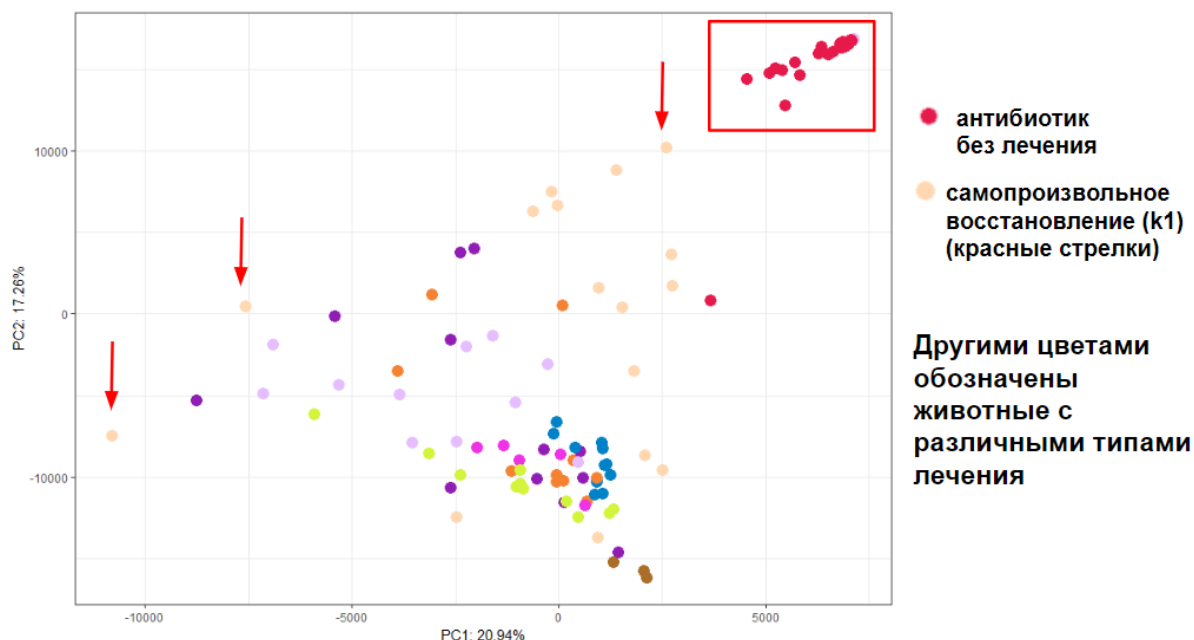


Рисунок 6. Восстановление микробиоты животных с помощью пробиотиков дает более однообразную картину, чем самопроизвольное восстановление микробиоты. После антибиотиков микробиота крыс резко меняется. Микробиота каждого животного на графике отображена отдельной точкой. Чем точки ближе друг к другу, тем более сходную микробиоту они представляют.

После этого мы обратили внимание, что у крыс после применения антибиотиков подавляющее большинство бактерий в кишечнике представлены гаммапротеобактериями (рис. 7). На представленном графике видно, что микробиота крыс до приема антибиотиков сильно отличается от микробиоты животных после его приема.

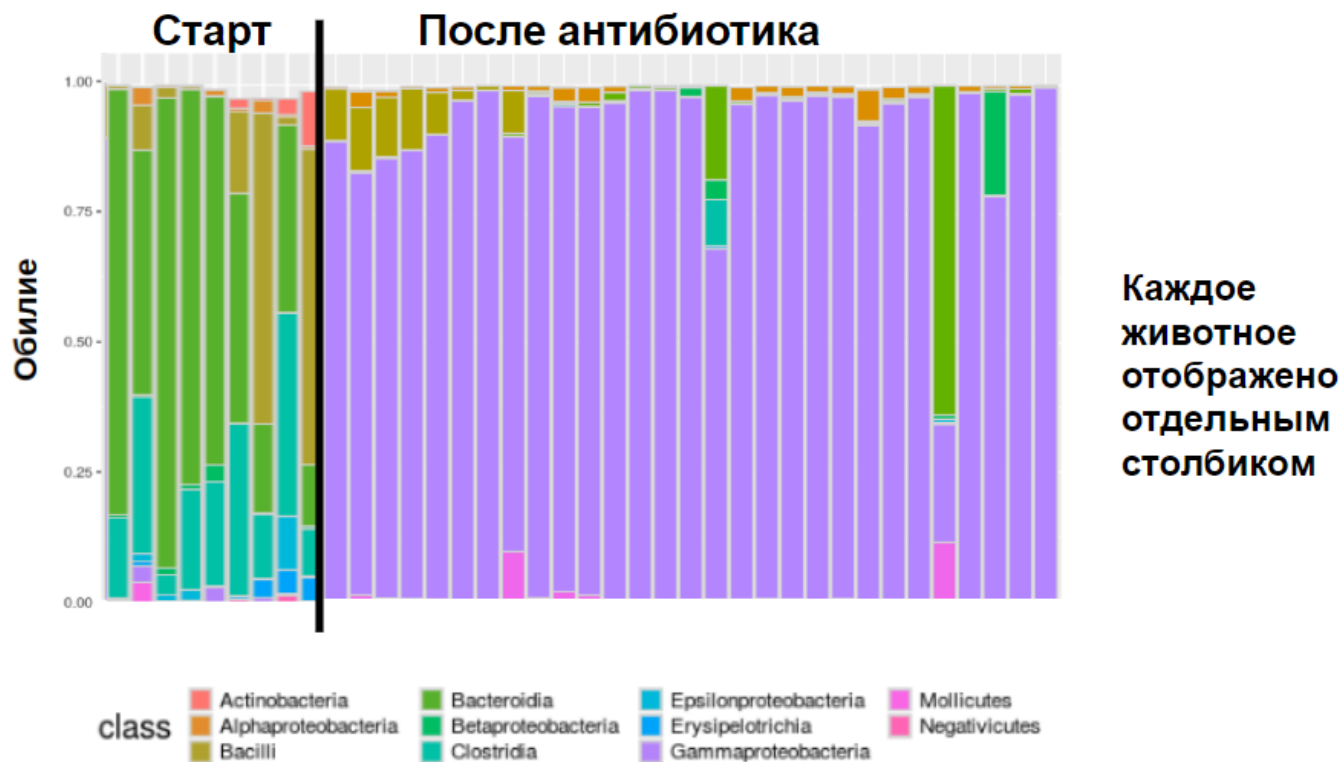


Рисунок 7. У животных после антибиотика в составе кишечной микробиоты велика доля *Gammaproteobacteria* (фиолетовый цвет). Разными цветами отображены бактерии разных классов.

Далее возник вопрос: как оценить эффективность лечения? Было решено посмотреть альфа-разнообразие (внутригрупповое разнообразие микробиоты) кишечной микробиоты для усредненной микробиоты кишечника каждой группы животных (рис. 8). Для оценки альфа-разнообразия был выбран индекс Shannon. Чем больше значение индекса, тем больше разнообразие микробов в исследуемом образце. Данный индекс помимо оценки количества бактериальных таксонов в образце также оценивает их представленность - таксоны, представленные в очень малом количестве не будут вносить большой вклад в оценку разнообразия.

По результатам расчетов был сделан вывод, что наиболее разнообразная микробиота была у крыс, которые после антибиотиков получали аутопробиотических бифидобактерии,

аутопробиотические энтерококки или же физиологический раствор в качестве лечения.

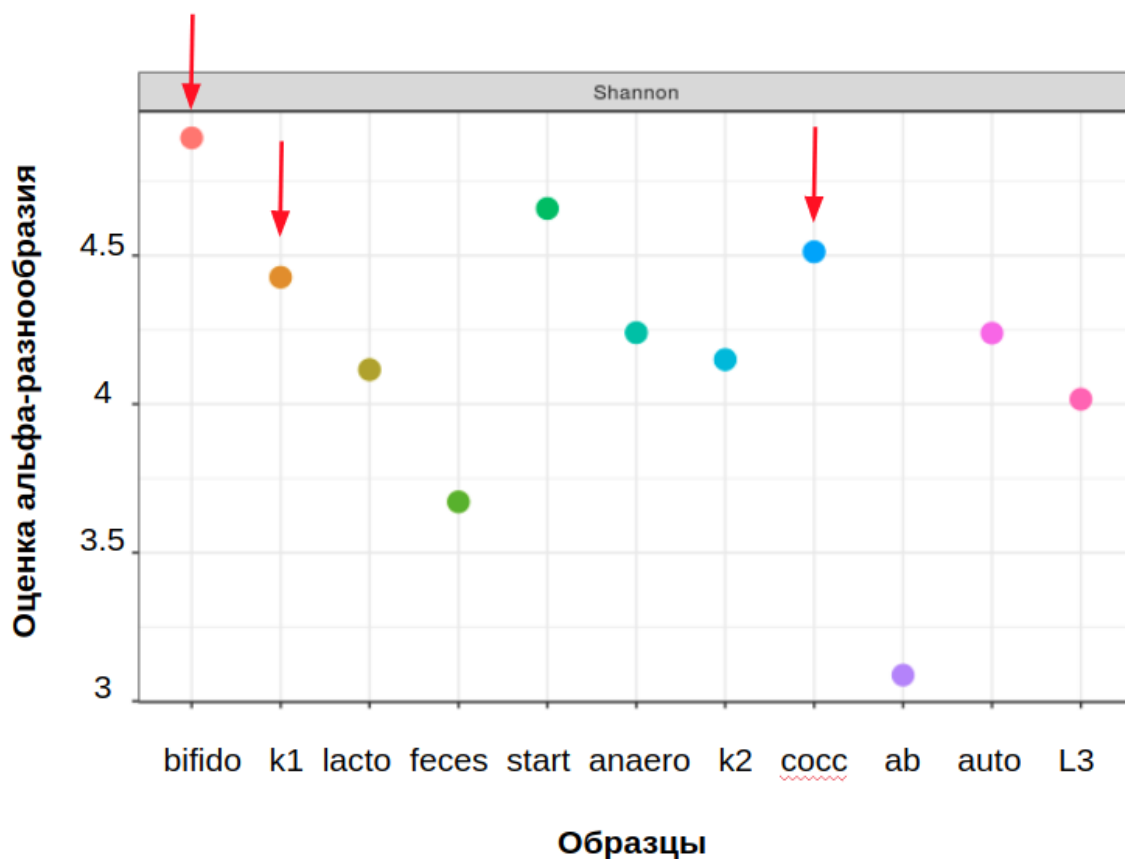


Рисунок 8. Альфа-разнообразие было наибольшим в группах животных, получавших в качестве лечения аутопробиотические бифидобактерии, аутопробиотические энтерококки и физиологический раствор.

Но показатель альфа-разнообразия говорит только о разнообразии кишечной микробиоты в каждой группе. Нам же было важнее узнать, какие типы лечения вернули микробиоту подопытных животных наиболее близко к стартовой точке.

Для этого мы оценили бета-разнообразие по усредненным группам животных по методу Bray-Curtis (рис. 9), а затем построили по этим данным дендрограмму.

Мы увидели, что кишечная микробиота животных, получавших аутопробиотические бифидобактерии и аутопробиотические энтерококки, наиболее близка к микробиоте

здоровых крыс по сравнению с другими типами лечения.

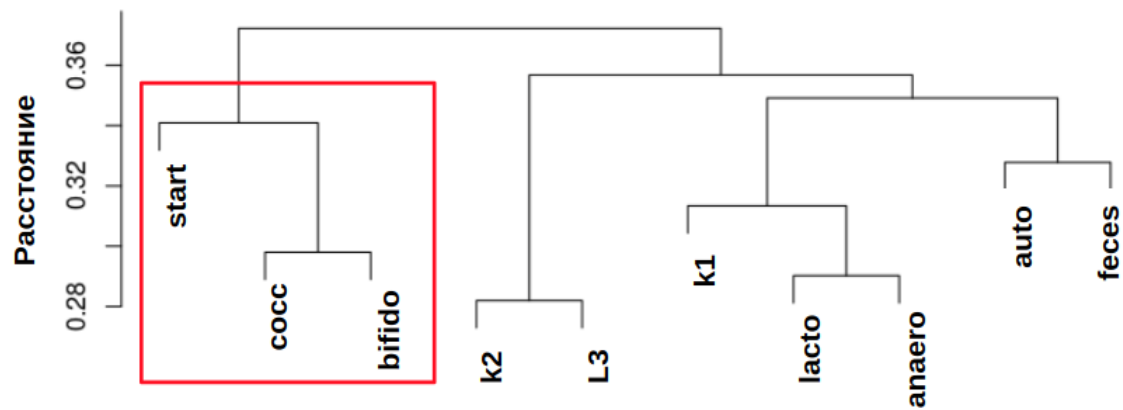


Рисунок 9. Дендрограмма по расчетам бета-разнообразия показала, что усредненная кишечная микробиота у животных, получавших в качестве лечения аутопробиотические энтерококки и аутопробиотические энтеробактерии наиболее близка к усредненной кишечной микробиоте крыс до начала эксперимента.

5. Обсуждение

Целью данной работы являлось изучение микробиоты кишечника при различных состояниях организма, а также поиск оптимальных видов/консорциумов бактерий, пригодных для терапии дисбиотических состояний на фоне приема антибиотиков.

Первоначальной задачей был поиск программ для анализа 16S сиквенсных данных, находящихся в открытом доступе, и выбор оптимальной из них.

В отличие от Plummer et al. [121] мы не ставили перед собой задачу детального сравнения различных программ. В первую очередь нас интересовало удобство использования и адекватность получаемых результатов.

По результатам нашего исследования (рис. 3) мы остановились на подходе, использующем CD-HIT-OTU-Miseq на этапе кластеризации и классификации (рис. 2). Помимо высокой скорости работы и легкости использования данный подход позволил нам сохранять больше данных (рис. 4) а также классифицировать большее число прочтений (рис. 5), чем изначальный аналитический подход (рис. 1).

Далее была проведена оценка изменений состава микробиоты при дисбиотическом состоянии и при различных видах аутопробиотического лечения. Нами было показано, что при дисбиотическом состоянии на фоне приема антибиотиков у животных наблюдается экспансия бактерий из класса *Gammaproteobacteria* (рис. 7). Сходные данные были получены и другими исследователями ранее [122].

Также мы обнаружили, что лечение аутопробиотиками даёт относительно однообразную картину восстановления кишечной микробиоты у животных с индуцированным дисбиозом. В то время как восстановление микробиоты кишечника под воздействием физиологического раствора у крыс было разнообразным и непредсказуемым (рис. 6).

Анализ альфа-разнообразия (рис. 8) и бета-разнообразия (рис. 9) показал, что наиболее эффективными способами лечения дисбиоза на фоне приема антибиотиков являются аутопробиотические бифидобактерии и аутопробиотические энтерококки.

6. Выводы

- 1) Сравнительный анализ биоинформатических подходов к классификации микроорганизмов на основании секвенирования генов 16S показал, что наиболее оптимальный подход - CD-НП-OTU-Miseq, позволяющий кластеризовать парные прочтения по отдельности.
- 2) При дисбиотическом состоянии на фоне приема антибиотиков в кишечной микробиоте крыс наблюдалась экспансия бактерий из класса *Gammaproteobacteria*. Микробиота животных, получавших аутопробиотических энтерококков и аутопробиотических бифидобактерий оказалась наиболее близкой к микробиоте здоровых животных. На данный момент мы считаем, что данные типы аутопробиотического лечения дисбиотических состояний на фоне приема антибиотиков являются наиболее эффективными.

7. Список использованной литературы

1. Tannock G, editor. 1995. Normal Microflora. Chapman & Hall, London.
2. Zoetendal EG, Vaughan E, de Vos W. 2006. A microbial world within us MicroReview. Mol Microbiol 59: 1639–1650 [PubMed]
3. Available at <http://mbio.asm.org/content/3/5/e00376-12.long> (accessed 2012-10-23)
4. Van den Abbeele P, Grootaert C, Marzorati M, Possemiers S, Verstraete W, Ge'ard P, Rabot S, Bruneau A, El Aidy S, Derrien M, Zoetendal E, Kleerebezem M, Smidt H, Van de Wiele T. 2010. Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for *Bacteroidetes* and *Clostridium* cluster IX. Appl Environ Microbiol 76: 5237–5246 [PMC free article][PubMed]
5. Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. 2012. New insights in gut microbiota establishment in healthy breast fed neonates. PLoS One 7:e44595. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22957008> (accessed 2012-08-30). [PMC free article] [PubMed]
6. Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, Nikk J, Monti D, Satokari R, Franceschi C, Brigidi P, De Vos W. 2010. Through Ageing, and Beyond: Gut Microbiota and Inflammatory Status in Seniors and Centenarians PLoS ONE 5:e10667. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871786/> (accessed 2010-05-17) [PMC free article][PubMed]
7. Budding AE, Grasman M, Lin F, Bogaards J, Soeltan-Kaersenhout D, Vandenbroucke-Grauls C, van Bodegraven A, Savelkoul P. 2010. IS-pro: high-throughput molecular fingerprinting of the intestinal microbiota. FASEB J 24: 4556–4564 [PubMed]
8. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P.

2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473: 174–180 [PMC free article] [PubMed]
9. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y, Keilbaugh S, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman F, Lewis J. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334: 105–108 [PMC free article][PubMed]
 10. Holmes I, Harris K, Quince C. 2012. Dirichlet multinomial mixtures: generative models for microbial metagenomics. *PLoS One* 7(2):e30126. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22319561> (accessed 2012-02-3) [PMC free article] [PubMed]
 11. Pessione E. 2012. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front Cell Infect Microbiol* 2: 86 [PMC free article] [PubMed]
 12. Kumar M, Nagpal R, Kumar R, Hemalatha R, Verma V, Kumar A, Chakraborty C, Singh B, Marotta F, Jain S, Yadav H. 2012. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp Diabetes Res* 2012: 902917 [PMC free article] [PubMed]
 13. Malo MS, Alam S, Mostafa G, Zeller S, Johnson P, Mohammad N, Chen K, Moss A, Ramasamy S, Faruqui A, Hodin S, Malo P, Ebrahimi F, Biswas B, Narisawa S, Millán J, Warren H, Kaplan J, Kitts C, Hohmann E, Hodin R. 2010. Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota. *Gut* 59: 1476–1484 [PubMed]
 14. Arumugam M et al (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473(7346):174–180
 15. Walker AW et al (2011) High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol* 11:7
 16. Lupp C et al (2007) Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* 2(2):119–129
 17. Cox, MJ, Cookson WO, Moffatt MF (2013) Sequencing the human microbiome in health and disease. *Hum Mol Genet* 22(R1):R88–R94
 18. Turnbaugh PJ et al (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444(7122):1027–1031
 19. Gregory JC et al (2015) Transmission of atherosclerosis susceptibility with gut microbial transplantation. *J Biol Chem* 290(9):5647–5660
 20. Rogers MA, Aronoff DM (2016) The influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the gut microbiome. *Clin Microbiol Infect* 178(2):e1–e9

21. Forslund K et al (2015) Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* 528(7581):262–266
22. Korpela K et al (2016) Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nat Commun* 7:10410
23. Furuya-Kanamori L et al (2015) Comorbidities, exposure to medications, and the risk of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 36(2):132–141
24. Galdston I (1944) Eubiotic medicine. *Science* 100(2587):76
25. Guslandi M (2011) Rifaximin in the treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 17(42):4643–4646
26. Pimentel M et al (2011) Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *N Engl J Med* 364(1):22–32
27. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007;369:1627–40. [PubMed]
28. Hansen J, Gulati A, Sartor RB. The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26:564–71. [PMC free article] [PubMed]
29. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:13780–5. [PMC free article] [PubMed]
30. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:16731–6. [PMC free article] [PubMed]
31. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*. 2011;60:631–7. [PubMed]
32. Miquel S, Martin R, Rossi O, Bermudez-Humaran LG, Chatel JM, Sokol H, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16:255–61. [PubMed]
33. Carroll IM, Chang YH, Park J, Sartor RB, Ringel Y. Luminal and mucosal-associated intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gut Pathog*. 2010;2:19. [PMC free article] [PubMed]

34. Krogius-Kurikka L, Lyra A, Malinen E, Aarnikunnas J, Tuimala J, Paulin L, et al. Microbial community analysis reveals high level phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome sufferers. *BMC Gastroenterol.* 2009;9:95.[PMC free article] [PubMed]
35. Salonen A, de Vos WM, Palva A. Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: present state and perspectives. *Microbiology.* 2010;156:3205–15. [PubMed]
36. De Palma G, Nadal I, Medina M, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, et al. Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiol.* 2010;10:63. [PMC free article] [PubMed]
37. Shen XJ, Rawls JF, Randall T, Burcal L, Mpande CN, Jenkins N, et al. Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut Microbes.* 2010;1:138–47.[PMC free article] [PubMed]
38. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:11070–5. [PMC free article] [PubMed]
39. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006;444:1022–3. [PubMed]
40. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr.* 2008;88:894–9. [PubMed]
41. Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes.* 2008;32:1720–4. [PubMed]
42. Kalliomaki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:534–8. [PubMed]
43. Nadal I, Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Garagorri JM, Moreno LA, et al. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int J Obes.* 2009;33:758–67. [PubMed]
44. Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Marti A, Martin-Matillas M, Campoy C, et al. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity.* 2009;17:1906–15.[PubMed]
45. Schwartz A, Taras D, Schafer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity.* 2010;18:190–5. [PubMed]

46. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:2365–70. [PMC free article] [PubMed]
47. Gaykema R, Goehler LE, Lyte M. Brain response to cecal infection with *Campylobacter jejuni*: analysis with Fos immunohistochemistry. *Brain Behav Immun*. 2004;18:238–45. [PubMed]
48. Goehler LE, Gaykema R, Opitz N, Reddaway R, Badr N, Lyte M. Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. *Brain Behav Immun*. 2005;19:334–44. [PubMed]
49. Goehler LE, Park SM, Opitz N, Lyte M, Gaykema R. *Campylobacter jejuni* infection increases anxiety-like behavior in the holeboard: possible anatomical substrates for viscerosensory modulation of exploratory behavior. *Brain Behav Immun*. 2008;22:354–66. [PMC free article] [PubMed]
50. Lyte M, Li W, Opitz N, Gaykema R, Goehler LE. Induction of anxiety-like behavior in mice during the initial stages of infection with the agent of murine colonic hyperplasia *Citrobacter rodentium*. *Physiol Behav*. 2006;89:350–7. [PubMed]
51. Li H, Cao Y. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids*. 2010;39:1107–16. [PubMed]
52. Lyte M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *Bioessays*. 2011;33:574–81. [PubMed]
53. Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:16050–5. [PMC free article] [PubMed]
54. Collins J, Borojevic R, Verdu EF, Huizinga JD, Ratcliffe EM. Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*. 2014;26:98–107.[PubMed]
55. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol*. 2004;558:263–75.[PMC free article] [PubMed]
56. Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:3047–52.[PMC free article] [PubMed]

57. Metchnikoff E. 1908. The prolongation of the life. Optimistic study. G.P. Putnam's sons, New York and London.
58. Aleshkin V, Amerhanova A, Pospelova V, Afanasiev S, Shenderov B. 2008. History, present situation, and prospects of probiotic research conducted in the G.N. Gabrichevsky Institute for Epidemiology and Microbiology. *Microbial Ecology in Health and Disease* 20: 113–115
59. Tannock GW. 2010. The bowel microbiota and inflammatory bowel diseases. *Int J Inflam* 5:954051. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3004003/> (accessed 2010-08-5) [PMC free article] [PubMed]
60. Hempel S, Newberry S, Maher A, Wang Z, Miles J, Shanman R, Johnsen B, Shekelle P. 2012. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 307: 1959–1969 [PubMed]
61. Woo TD, Oka K, Takahashi M, Hojo F, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Yonezawa H, Kamiya S. 2011. Inhibition of the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* in vitro by *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 strain. *J Med Microbiol* 60: 1617–1625 [PubMed]
62. Bausserman M, Michail S. 2005. The use of *Lactobacillus* GG in irritable bowel syndrome in children: a double-blind randomized control trial. *J Pediatr* 147: 197–201 [PubMed]
63. Guyonnet D, Chassany O, Ducrotte P, Picard C, Mouret M, Mercier CH, Matuchansky C. 2007. Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double blind, controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 26: 475–486 [PubMed]
64. Whorwell PJ, Altringer L, Morel J, Bond Y, Charbonneau D, O'Mahony L, Kiely B, Shanahan F, Quigley EM. 2006. Efficacy of an encapsulated probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 101: 1581–1590 [PubMed]
65. Enck P, Zimmermann K, Menke G, Klosterhalfen S. 2009. Randomized controlled treatment trial of irritable bowel syndrome with a probiotic *E. coli* preparation (DSM17252) compared to placebo. *Z Gastroenterol* 47: 209–214 [PubMed]
66. Prantera C, Scribano M, Falasco G, Andreoli A, Luzzi C. 2002. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomized controlled trial with *Lactobacillus* GG. *Gut* 51: 405–409 [PMC free article] [PubMed]

67. Bousvaros A, Guandalini S, Baldassano RN, Botelho C, Evans J, Ferry GD, Goldin B, Hartigan L, Kugathasan S, Levy J, Murray KF, Oliva-Hemker M, Rosh JR, Tolia V, Zholudev A, Vanderhoof JA, Hibberd PL. 2005. A randomized, double-blind trial of *Lactobacillus* GG versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 11: 833–839 [PubMed]
68. Garcia Vilela E, Ferrari M, Torres H, Guerra Pinto A, Carolina Carneiro Aguirre A, Paiva Martins F, Marcos Andrade Goulart E, Sales Da Cunha A. 2008. Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. *Scand J Gastroenterol* 43: 842–848[PubMed]
69. Adam B, Liebrechts T, Holtmann G. 2006. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Z Gastroenterol* 44: 267–269[PubMed]
70. Zocco MA, dal Verme L, Cremonini F, Piscaglia A, Nista E, Candelli M, Novi M, Rigante D, Cazzato IA, Ojetti V, Armuzzi A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. 2006. Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 23: 1567–1574 [PubMed]
71. Ritchie M, Romanuk T. 2012. A Meta-Analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PLoS One*. 7: e34938. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22529959> (accessed 2012-04-18) [PMC free article] [PubMed]
72. Farup PG, Jacobsen M, Ligaarden SC, Rudi K. 2012. Probiotics, symptoms, and gut microbiota: what are the relations? A randomized controlled trial in subjects with irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Res Pract* 2012:214102. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415104/> (accessed 2012-07-31) [PMC free article] [PubMed]
73. Lee BJ, Bak Y. 2011. Irritable bowel syndrome, gut microbiota and probiotics. *J Neurogastroenterol Motil* 17: 252–266 [PMC free article] [PubMed]
74. McFarland LV, Dublin S. 2008. Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 14: 2650–2661 [PMC free article] [PubMed]
75. Besselink MG, van Santvoort H, Buskens E, Boermeester M, van Goor H, Timmerman H, Nieuwenhuijs V, Bollen T, van Ramshorst B, Witteman B, Rosman C, Ploeg R, Brink M, Schaapherder A, Dejong C, Wahab P, van Laarhoven C, van der Harst E, van Eijck C, Cuesta M, Akkermans L, Gooszen H, Dutch Acute Pancreatitis Study Group 2008.

- Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 371: 651–659 [PubMed]
76. Matsushima M, Takagi AJ. 2012. “Is it effective?” to “How to use it?”: the era has changed in probiotics and functional food products against *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 27: 851–853 [PubMed]
 77. Wallace TC, Guarner F, Madsen K, Cabana M, Gibson G, Hentges E, Sanders ME. 2011. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr Rev* 69: 392–403 [PubMed]
 78. Dobson A, Cotter P, Ross RP, Hill C. 2012. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol* 78: 1–6 [PMC free article] [PubMed]
 79. Tsapieva A, Duplik N, Suvorov A. 2011. Structure of plantaricin locus of *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. *Benef Microbes* 2: 255–261 [PubMed]
 80. Yermolenko E, Kolobov A, Chernysh A, Suvorov A. 2011. Influence of synthetic peptide inducers on antibacterial activity of enterococci. *Beneficial Microbes* 1: 253–257 [PubMed]
 81. Batdorj B, Dalgarrondo M, Choiset Y, Pedroche J, Métro F, Prévost H, Chobert JM, Haertlé T. 2006. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *J Appl Microbiol* 101: 837–848 [PubMed]
 82. Atanassova M, Choiset Y, Dalgarrondo M, Chobert JM, Dousset X, Ivanova I, Haertlé T. 2003. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3 from Bulgarian yellow cheese. *Int J Food Microbiol* 87: 63–73 [PubMed]
 83. Machado MV, Cortez-Pinto H. 2012. Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 11: 440–449 [PubMed]
 84. Nakamura Y, Omaye S. 2012. Metabolic diseases and pro- and prebiotics: Mechanistic insights. *Nutr Metab (Lond)* 19:60 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3464869/> (accessed 2012-06-19) [PMC free article] [PubMed]
 85. Cani PD, Delzenne N. 2009. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Curr Opin Pharmacol* 9: 737–743 [PubMed]
 86. Macho Fernandez E, Valenti V, Rockel C, Hermann C, Pot B, Boneca IG, Grangette C. 2011. Antiinflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan derived muropeptide. *Gut* 60: 1050–1059 [PubMed]

87. Mangalat N, Liu Y, Fatheree NY, Ferris MJ, Van Arsdall MR, Chen Z, Rahbar MH, Gleason WA, Norori J, Tran DQ, Rhoads JM. 2012. Safety and tolerability of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and Effects on biomarkers in healthy adults: results from a randomized masked trial. PLoS One 7:e43910. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3435331/> (accessed 2012-09-6) [PMC free article] [PubMed]
88. Hooper LV, Littman D, Macpherson A. 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. Science 336: 1268–1273 [PMC free article] [PubMed]
89. Petrof E, Claud E, Sun J, Abramova T, Guo Y, Waypa T, He S, Nakagawa Y, Chang E. 2009. Bacteria-free solution derived from *Lactobacillus plantarum* inhibits multiple NFkappaB pathways and inhibits proteasome function. Inflamm Bowel Dis 15: 1537–1547 [PMC free article] [PubMed]
90. Schlee M, Harder J, Köten B, Stange E, Wehkamp J, Fellermann K. 2008. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte β -defensin 2. Clin Exp Immunol 151: 528–535 [PMC free article] [PubMed]
91. Yoon SS, Sun J. 2011. Probiotics, nuclear receptor signaling, and anti-inflammatory pathways. Gastroenterol Res Pract 2011: 971–938 [PMC free article] [PubMed]
92. Tarasova E, Yermolenko E, Donets V, Sundukova Z, Bochkareva A, Borschev I, Suvorova M, Ilyasov I, Simanenkova V, Suvorov A. 2010. The influence of probiotic enterococci on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics. Beneficial Microbes 1: 265–270 [PubMed]
93. Khailova L, Dvorak K, Arganbright KM, Halpern MD, Kinouchi T, Yajima M, Dvorak B. 2009. *Bifidobacterium bifidum* improves intestinal integrity in a rat model of necrotizing enterocolitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 297: G940–G949 [PMC free article] [PubMed]
94. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, Brewer M. 2009. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. Am J Physiol 296: 1140–1149 [PubMed]
95. Ukena S, Singh A, Dringenberg U, Engelhardt R, Seidler U, Hansen W, Bleich A, Bruder D, Franzke A, Rogler G, Suerbaum S, Buer J, Gunzer F, Westendorf AM. 2007. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity,” PLoS ONE, 2: IDE1308. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2110898/> (accessed 2007-12-12) [PMC free article][PubMed]

96. Collins J, van Pijkeren J, Svensson L, Claesson M, Sturme M, Li Y, Cooney J, van Sinderen D, Walker AW, Parkhill J, Shannon O, O'Toole P. 2012. Fibrinogen-binding and platelet-aggregation activities of a *Lactobacillus salivarius* septicemia isolate are mediated by a novel fibrinogen-binding protein. *Mol Microbiol* 85: 862–877 [PubMed]
97. Kankainen M, Paulin L, Tynkkynen S, von Ossowski I, Reunanen J, Partanen P, Satokari R, Vesterlund S, Hendrickx AP, Lebeer S, De Keersmaecker SC, Vanderleyden J, Hämäläinen T, Laukkanen S, Salovuori N, Ritari J, Alatalo E, Korpela R, Mattila-Sandholm T, Lassig A, Hatakka K, Kinnunen KT, Karjalainen H, Saxelin M, Laakso K, Surakka A, Palva A, Salusjärvi T, Auvinen P, de Vos WM. 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17193–17198 [PMC free article] [PubMed]
98. Damman CJ, Miller SI, Surawicz CM, Zisman TL. 2012. The microbiome and inflammatory bowel disease: is there a therapeutic role for fecal microbiota transplantation? *Am J Gastroenterol* 107: 1452–1459 [PubMed]
99. Brandt LJ. 2012. Fecal transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *Gastroenterol Hepatol N Y* 8: 191–194 [PMC free article] [PubMed]
100. Bondarenko V, Suvorov A, editors. 2007. Symbiotic enterococci and the problem of enterococcal infection, Sandoz, Moscow (in Russian).
101. Suvorov A, Simanenkova V, Gromova L, Kolodjjeva V, Tsapieva A, Chernish A, Solovieva O, Ermolenko E. 2011. Enterococci as probiotics or autoprobiotics. In *Prebiotics and probiotics potential for human health*, Ivanova I (ed), Paisi Hilendarski, Sofia, pp. 104–112.
102. Shenderov B, editor. 2011. Probiotics and functional foods, in *Food Engineering*, Eolss Publishers, Oxford.
103. Huse SM, Welch DM, Morrison HG, Sogin ML. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ Microbiol.* 2010;12(7):1889-98. Epub 2010/03/20. doi: EMI2193 [pii] 10.1111/j.1462-2920.2010.02193.x. PubMed PMID: 20236171; PubMed CentralPMCID: PMC2909393.
104. Sun Y, Cai Y, Huse SM, Knight R, Farmerie WG, Wang X, Mai V. A large-scale benchmark study of existing algorithms for taxonomy-independent microbial community analysis. *Brief Bioinform.* 2012;13(1):107-21. Epub

- 2011/04/29. doi: bbr009 [pii] 10.1093/bib/bbr009. PubMed PMID: 21525143; PubMed CentralPMCID: PMC3251834.
105. Quince C, Lanzen A, Curtis TP, Davenport RJ, Hall N, Head IM, Read LF, Sloan WT. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat Methods*. 2009;6(9):639-41. Epub 2009/08/12. doi: 10.1038/nmeth.1361. PubMed PMID: 19668203.
 106. Reeder J, Knight R. Rapidly denoising pyrosequencing amplicon reads by exploiting rank-abundance distributions. *Nat Methods*. 2010;7(9):668-9. Epub 2010/09/02. doi: 10.1038/nmeth0910-668b. PubMed PMID: 20805793; PubMed CentralPMCID: PMC2945879
 107. Quince C, Lanzen A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ. Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:38. Epub 2011/02/01. doi: 1471-2105-12-38 [pii] 10.1186/1471-2105-12-38. PubMed PMID: 21276213; PubMed CentralPMCID: PMC3045300.
 108. Haas BJ, Gevers D, Earl AM, Feldgarden M, Ward DV, Giannoukos G, Ciulla D, Tabbaa D, Highlander SK, Sodergren E, Methe B, DeSantis TZ, Petrosino JF, Knight R, Birren BW. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res*. 2011;21(3):494-504. Epub 2011/01/08. doi: 10.1101/gr.112730.110. PubMed PMID: 21212162; PubMed CentralPMCID: PMC3044863.
 109. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011;27(16):2194-200. Epub 2011/06/28. doi: btr381 [pii] 10.1093/bioinformatics/btr381. PubMed PMID: 21700674; PubMed CentralPMCID: PMC3150044.
 110. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform independent, community-supported software for describing

- and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(23):7537-41. Epub 2009/10/06. doi: AEM.01541-09 [pii] 10.1128/AEM.01541-09. PubMed PMID: 19801464; PubMed CentralPMCID: PMC2786419.
111. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, HuttleyGA, Kelley ST, Knights D, KoenigJE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010;7(5):335-6. Epub 2010/04/13. doi: nmeth.f.303 [pii] 10.1038/nmeth.f.303. PubMed PMID: 20383131
 112. Masella AP, Bartram AK, Truszkowski JM, Brown DG, Neufeld JD. PANDAsseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:31. doi: 10.1186/1471-2105-13-31. PubMed PMID: 22333067; PubMed CentralPMCID: PMC3471323.
 113. Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics.* 2014;30(5):614-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btt593. PubMed PMID: 24142950; PubMed Central PMCID: PMC3933873.
 114. Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* 2011;27(21):2957-63. doi: 10.1093/bioinformatics/btr507. PubMed PMID: 21903629; PubMed Central PMCID: PMC3198573
 115. Liu B, Yuan J, Yiu SM, Li Z, Xie Y, Chen Y, Shi Y, Zhang H, Li Y, Lam TW, Luo R. COPE: an accurate k-merbased pair-end reads connection tool to facilitate genome assembly. *Bioinformatics.* 2012;28(22):2870-4. doi: 10.1093/bioinformatics/bts563. PubMed PMID: 23044551

116. Huang Y, Niu B, Gao Y, Fu L, Li W. CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics*. 2010;26(5):680-2. Epub 2010/01/08. doi: 10.1093/bioinformatics/btq003. PubMed PMID: 20053844; PubMed Central PMCID: PMC2828112.
117. Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 2006;22(13):1658-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btl158. PubMed PMID: ISI:000238905700017.
118. Li W, Jaroszewski L, Godzik A. Clustering of highly homologous sequences to reduce the size of large protein databases. *Bioinformatics*. 2001;17(3):282-3. PubMed PMID: ISI:000168053800009.
119. Li WZ, Jaroszewski L, Godzik A. Tolerating some redundancy significantly speeds up clustering of large protein databases. *Bioinformatics*. 2002;18(1):77-82. PubMed PMID: ISI:000173794400011.
120. Li W, Fu L, Niu B, Wu S, Wooley J. Ultrafast clustering algorithms for metagenomic sequence analysis. *Brief Bioinform*. 2012;13(6):656-68. Epub 2012/07/10. doi: 10.1093/bib/bbs035. PubMed PMID: 22772836; PubMed Central PMCID: PMC3504929.
121. Plummer E, Twin J, Bulach DM, Garland SM, Tabrizi SN (2015) A Comparison of Three Bioinformatics Pipelines for the Analysis of Preterm Gut Microbiota using 16S rRNA Gene Sequencing Data. *J Proteomics Bioinform* 8: 283-291. doi:10.4172/jpb.1000381
122. Spees AM, Wangdi T, Lopez CA, Kingsbury DD, Xavier MN, Winter SE, Tsolis RM, Bäumlér AJ. Streptomycin-induced inflammation enhances *Escherichia coli* gut colonization through nitrate respiration. *MBio*. 2013;4:4. doi: 10.1128/mBio.00430-13.